

KINETIKA PERTUMBUHAN SEL *SACHAROMYCES CEREVISIAE* DALAM MEDIA TEPUNG KULIT PISANG

Mahreni¹ dan Sri Suhenry

Prodi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri,
Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Yogyakarta
Jl. SWK No. 104 Lingkar Utara Condong Catur Yogyakarta, (55283),
Telp/Faks:0274 486889

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari pengaruh volume dan pH media terhadap kecepatan pertumbuhan sel ragi (*Sacharomyces cerevisiae*) dalam tahap inokulasi di dalam media tepung kulit pisang. Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap yaitu tahap persiapan bahan baku, tahap pembibitan (*seeding*) dan tahap inokulasi. Inokulasi dilakukan di dalam volume media tepung kulit pisang yang volumenya divariasi (40-200 ml) pada pH (3 sampai dengan 5). Inkubasi dilakukan selama 24 jam. Setiap 3 jam jumlah sel dianalisis menggunakan haemocytometer untuk menentukan jumlah sel dan kecepatan pertumbuhan sel. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada daerah pH (3-5) dan volume media (40-200) ml, pola pertumbuhan sel melalui beberapa tahap yaitu tahap lag, tahap percepatan pertumbuhan, tahap ekponensial, tahap stagnan dan tahap kematian. Volume media terbaik adalah 160 ml dan pH terbaik adalah pada pH=5. Pada kondisi ini menghasilkan jumlah sel terbanyak yaitu $10^{6,07}$. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penambahan volume media di atas 160 ml hanya sedikit berpengaruh terhadap jumlah sel *sacharomyces cerevisiae* yang dihasilkan. Konstante kecepatan pertumbuhan spesifik (*u*) paling tinggi dicapai pada volume media 40 ml dan pH=5 yaitu $u=0.047971/\text{jam}$.

Kata kunci: ragi roti, kulit pisang; biomasa; fase pertumbuhan.

1. Pendahuluan.

Fungi termasuk tanaman yang tidak berkloropil sehingga tidak mampu untuk mensintesis makanannya sendiri. Fungi sel tunggal disebut yeast (ragi) dan jamur (mold) adalah fungi multiseluler. Ragi dan jamur adalah biomasa yang penting dalam industri makanan (Presec^{ki}, 2005).

Ragi banyak dijumpai di alam terutama banyak ditemukan pada buah-buahan, biji-bijian dan makanan yang mengandung gula. Ragi juga ditemukan di tanah, udara dan kulit binatang. Karena ragi tidak mempunyai kloropil, maka hidupnya tergantung kepada tanaman atau hewan yang ditempati untuk mendapatkan energi. Sel ragi berbentuk bulat sampai oval dengan ukuran lebar 1-5 μm dan panjang di antara 5-30 μm . Kulit sel sangat tipis ketika masih muda tetapi semakin tebal setelah dewasa. Berkembang biak dengan berkecambah (*budding*). Salah satu jenis ragi yang paling penting adalah *Saccharomyces cerevisiae* selalu digunakan untuk memproduksi anggur, beer dan sebagai pengembang roti. Dalam penelitian ini ragi roti akan diproduksi dalam bentuk sel (biomasa) kering dan aktif sehingga proses produksi diarahkan untuk menghasilkan jumlah sel sebanyak-banyaknya dengan mengoptimisasi pH dan volume media inokulasi.

1.1 Pengukuran pertumbuhan sel.

Pertumbuhan dalam sistem biologi dapat diartikan sebagai penambahan komponen kimia. Pertambahan berat tidak selalu disamakan dengan pertumbuhan karena sel dapat bertambah beratnya dengan tidak memperbanyak sel tetapi dengan memperbesar kantung penampung hasil metabolisme seperti *glycogen* atau *poly-beta-hydroxybutyrate*. Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai pertambahan jumlah sel dengan bertambahnya RNA, DNA, protein dan air dalam sel. Untuk mengukur kecepatan pertumbuhan sel maka dilakukan perhitungan secara kuantitatif dengan cara menghitung jumlah atau berat sel pada setiap waktu selama pertumbuhan berlangsung. Pengukuran jumlah sel dapat dilakukan dengan menggunakan mikroskop (*haemocytometer*) untuk menghitung jumlah sel dengan ukuran 3 μm atau lebih besar. Sedangkan untuk menghitung jumlah sel yang ukurannya lebih kecil dari 3 μm menggunakan *Petroff-Hauser counting chamber*.

¹ Korespondensi: mahreni_03@yahoo.com

1.2. Kecepatan pertumbuhan

Fase pertumbuhan sel dapat dibagi menjadi beberapa tahap yaitu: (i) *fase lag* (pertumbuhan sama dengan nol), (ii) fase percepatan pertumbuhan (pertumbuhan cepat mengikuti kurve eksponensial), (iii) fase stagnan (kecepatan pertumbuhan tetap) dan fase kematian (pertumbuhan semakin lambat dan sebagian sel mati). Pada fase lag jumlah sel tetap, tetapi sel dapat bertambah besar pada periode ini. Beberapa parameter yang mempengaruhi waktu fase lag adalah jenis dan umur sel mikroorganisma, ukuran inokulum dan kondisi media tumbuh. Apabila sel tumbuh di dalam medium yang kekurangan nutrisi atau eksese nutrisi, maka waktu fase lag lebih lama. Karena sel harus menghasilkan enzim yang sesuai dengan jenis nutrisi yang ada. Apabila sel dipindahkan dari media yang mempunyai konsentrasi nutrisi tinggi ke konsentrasi nutrisi rendah, biasanya tidak melalui fase lag. Parameter lain yang mempengaruhi waktu fase lag adalah ukuran inokulum. Apabila sel dengan ukuran kecil ditumbuhkan dalam media yang volumenya besar, sel akan mengalami fase lag yang lama (Lee, 1992).

Untuk memproduksi biomassa skala besar tujuan yang akan dicapai adalah memperpendek fase lag oleh karena itu untuk memproduksi sel dalam skala besar, diperlukan volume media inokulasi yang relatif besar.

1.3 Pertumbuhan pada fase eksponensial

Pada fase eksponensial sel dengan cepat membelah diri dan sesuai dengan orde satu terhadap densitas jumlah sel (C_n =jumlah sel/volume). Persamaan matematik kinetika pertumbuhan sel dituliskan sesuai dengan persamaan (1-4) (Lee, 1992).

$$r_n = \frac{dC_n}{dt} = \mu C_n \quad (1)$$

μ = specific growth rate (h^{-1})

$$\int_{C_{n_0}}^{C_n} \frac{dC_n}{C_n} = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (2)$$

$$C_n = C_{n_0} \exp[\mu(t - t_0)] \quad (3)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_s + C_s} \quad (\text{Persamaan Monod}) \quad (5)$$

K_s adalah konsentrasi substrat pada saat $\mu = \frac{1}{2} \mu_{max}$

Apabila konsentrasi substrat jauh lebih besar dibandingkan dengan K_s maka $\mu = \mu_{max}$ dan apabila sebaliknya maka :

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_s}{K_s} \quad (6)$$

1.4 Inhibisi produk

Selama sel tumbuh, menghasilkan produk metabolisme yang terakumulasi di dalam media tumbuh. Produk metabolisme ini dapat menghambat pertumbuhan sel itu sendiri dan pada konsentrasi produk metabolit tertentu sel tidak dapat tumbuh lagi karena produk metabolit adalah racun bagi sel. Kecepatan pertumbuhan akan semakin lambat seiring dengan kenaikan konsentrasi produk metabolit. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) menjadi tergantung bukan hanya terhadap konsentrasi substrat saja tetapi juga dipengaruhi oleh konsentrasi produk metabolit C_p .

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_s}{K_s + C_s} \right) \left(\frac{K_p}{K_p + C_p} \right) \quad (7)$$

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_s}{K_s + C_s} \right) \left(1 - \frac{C_p}{C_{pm}} \right)^n \quad (8)$$

C_{pm} adalah konsentrasi produk ketika sel tidak dapat tumbuh lagi.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konstante kecepatan pertumbuhan spesifik sel *sacharomyces cerevisiae* (FNCC-3049) (*u*) pada setiap fase pertumbuhan. Pertambahan jumlah sel dihitung setiap selang waktu 3 jam sampai dengan 24 jam menggunakan alat *haemocytometer* (Woro dan Basuki, 1996).

2. Metodologi.

2.1 Bahan dan alat penelitian.

Dalam penelitian ini menggunakan bahan-bahan: (1) bahan baku kulit pisang ambon dan bibit *Saccharomyces cerevisiae* FNCC-3049. Bibit sel dalam bentuk biakan murni yang diperoleh dari PAU UGM. Kulit pisang ambon dibuat dalam bentuk bubur kemudian dihidrolisis menggunakan HCl. Hasil hidrolisis digunakan sebagai media inokulasi. (2) Baha pembantu: taoge, gula pasir ($C_{12}H_{22}O_{11}$), air suling, agar, alkohol 70%, spiritus, kapas steril, paraffin cair, ammonium sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) 99,5%, asam klorida (HCL) 37%, kertas sampul steril, karet dan natrium hidroksida (NaOH) 99%.

Alat penelitian terdiri dari shaker dan gelas erlenmeyer. Alat Analisis terdiri dari: timbangan biasa, pH stick, mikroskop, gelas penutup, Haemocytometer, Oven, termometer, kertas saring whatman 93; timbangan listrik. Alat proses: pisau, blender, kompor listrik, pengaduk, saringan, autoklaf, tabung reaksi, pipet gondok, jarum ose, Erlenmeyer, baker glass, toples steril, Shaker, aerator, venturimeter, sentrifuge dan Counter.

2.2 Cara Kerja

2.2.1 Pembiakan *Saccharomyces cerevisiae* dalam media agar miring.

Pembuatan media agar miring dengan cara memasukkan 12,5 g taoge dan 2,5 g agar dalam bentuk serbuk ke dalam beaker glass yang sudah steril kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume larutan 125 ml dan dipanaskan sampai mendidih selama 15 menit sambil diaduk hingga homogen. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan diperoleh larutan. Larutan tersebut ditambah 7,5 g gula pasir dan dipanaskan lagi sampai mendidih sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu ditambahkan aquades yang hilang karena penguapan sampai volume 125 ml. media yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditutup dengan kapas yang telah direndam dalam parafin. Tabung reaksi yang telah berisi larutan disterilkan pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan sambil tabung reaksi dimiringkan (media agar miring) sampai suhu ruangan. Media agar miring yang telah memadat ditanami masing-masing 2 ose biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* dengan cara penggoresan (*streak plate method*) menggunakan jarum ose steril, lalu diinkubasikan pada suhu ruangan selama 48 jam. Setelah 48 jam akan diperoleh kultur sub-master *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2 Tahap Persiapan Bahan.

Kulit pisang ambon yang masih cukup segar dicuci dan dikupas bagian luarnya untuk mengurangi rasa sepat kemudian dipotong-potong menjadi kepingan tipis. Setelah itu ditimbang dan dijemur dibawah matahari sampai kering. Hasil jemuran dihaluskan dengan blender dan disaring, sehingga didapatkan bubuk kulit pisang ambon. Bubuk tersebut ditimbang sampai berat konstan, dimana kadar airnya (10-12)% kemudian dimasukkan ke dalam toples steril dan ditutup rapat, lalu disimpan ditempat kering. Selanjutnya tahap hidrolisis. Bubuk kulit pisang ambon sebanyak 163,64 g dibuat bubur di dalam beaker glass dengan penambahan aquades sebesar 1636,36 ml kemudian ditambahkan 883,41 g gula pasir dan 83,95 g ammonium sulfat, juga HCl 10 % sebanyak 180 ml. selanjutnya dipanaskan dengan kompor listrik sampai mendidih selama 30 menit sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu didinginkan sampai suhu ruangan. Hasil hidrolisis disaring, sehingga didapatkan filtrat berupa cairan tanpa padatan. Filtrat inilah yang digunakan untuk media starter dan media fermentasi. Media starter dan media fermentasi diatur pH nya dengan NaOH 99%, dimana pada media starter pH bervariasi (3; 3,5; 4; 4,5; 5) dan media fermentasi diatur pada pH optimum. Setelah itu media starter dibagi ke dalam 25 buah Erlenmeyer steril, masing-masing 40 ml. Sedangkan media fermentasi dibagi ke dalam 4 buah Erlenmeyer steril, masing-masing 200 ml. Selanjutnya semua Erlenmeyer tersebut ditutup dengan kapas steril yang dibungkus kertas sampul dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit dan kemudian didinginkan sampai suhu ruangan. Hasilnya adalah media starter (inokulan) dan media fermentasi yang sudah steril.

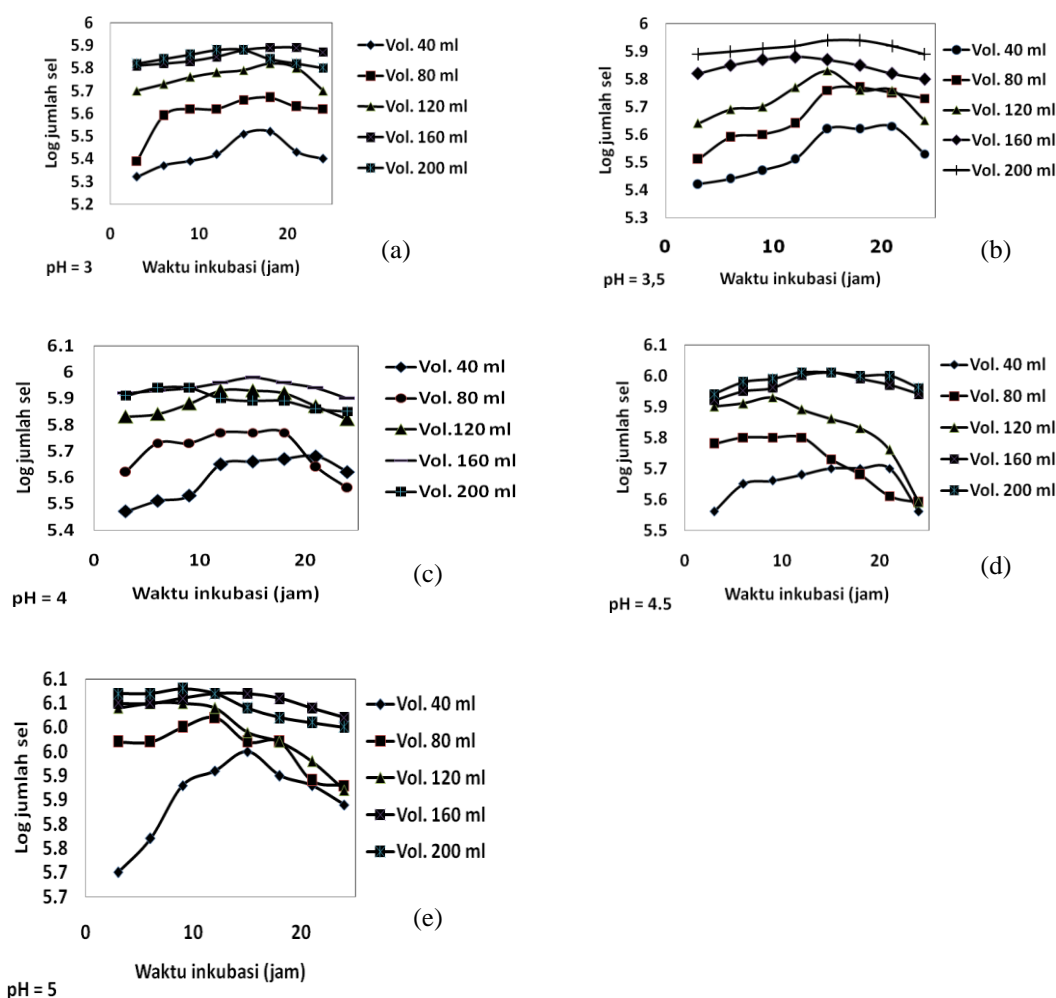
2.2.3 Tahap Pembuatan Starter (inokulan).

Pembuatan starter dimulai dengan melakukan inokulasi 1 ml biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* yang sudah dicairkan ke dalam 5 buah Erlenmeyer steril yang masing-masing berisi 40 ml larutan media dengan pH nya 3; 3,5; 4; 4,5; dan 5 dan digojog sampai merata. Setelah itu diinkubasi dengan shaker pada suhu ruangan, dimana setiap 3 jam sekali diambil 1 ml starter untuk dianalisis jumlah selnya sampai 24 jam. Dari hasil analisis

jumlah sel dapat dibuat grafik pertumbuhan sel *Saccharomyces cerevisiae*. Dengan grafik pertumbuhan sel tersebut, fase stasioner dapat terlihat, sehingga saat tercapai fase tersebut dilakukan penambahan 40 ml media starter steril pertama untuk masing-masing pH kemudian diinkubasi dengan shaker pada suhu ruangan, dimana setiap 3 jam sekali diambil 1 ml starter untuk dianalisis jumlah selnya sampai 24 jam. Perlakuan tersebut diulang sampai penambahan 40 ml media starter steril keempat untuk masing-masing pH. Dari grafik pertumbuhan tersebut didapat pH dan waktu inkubasi optimum, dimana pada kondisi tersebut jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* yang dihasilkan terbanyak. Pada tahap fermentasi, pH dikondisikan pada pH optimum dan pada waktu inkubasi optimum itulah starter siap diinokulasikan ke dalam media fermentasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Data hasil perhitungan jumlah sel terhadap waktu inkubasi ditampilkan pada gambar 1- 6. Gambar 1-6 adalah grafik hubungan log jumlah sel sebagai fungsi waktu inkubasi. Kondisi suhu inkubasi sama dengan suhu ruangan. Variasi pH (3; 3,5; 4; 4,5; 5) dan variasi volume media inokulasi (40-200) ml.



Gambar 1. Grafik log jumlah sel vs waktu inkubasi dengan variasi volume (40-200) ml: (a) pH = 3; (b) pH = 3,5; (c) pH = 4,0; (d) pH = 4,5; dan (e) pH = 5

Tabel 1. Hubungan antara pH, volume media inokulasi dan konstante kecepatan pertumbuhan sel (u)

pH	Volume media (ml)	Fase lag (jam ke.)	Fase eksponensial (jam ke.)/ u (jam ⁻¹)	Fase stagnan (jam ke.)	Fase kematian (jam ke.)
3	40	Tidak ada	3-18/0,0307	Tidak ada	21-24
	80	Tidak ada	3-18/0.0370	Tidak ada	21-24
	120	Tidak ada	3-18/0.0168	Tidak ada	21-24
	160	Tidak ada	3-18/0.0134	18-21	21-24
	200	Tidak ada	3-12/0.0153	12-15	15-24
3,5	40	Tidak ada	3-15/0.0383	15-18	21-24
	80	Tidak ada	3-18/0.0399	Tidak ada	18-24
	120	Tidak ada	3-15/0.0364	15-21	21-24
	160	Tidak ada	3-15/0.0153	tidak ada	18-24
	200	Tidak ada	3-15/0.0095	15-18	18-24
4,0	40	Tidak ada	3-21/0.0268	Tidak ada	21-24
	80	Tidak ada	3-9/0.02558	12-18	21-24
	120	Tidak ada	3-12/0.0255	12-15	18-24
	160	Tidak ada	3-18/0.0102	tidak ada	18-24
	200	Tidak ada	3-15/0.0153	15-18	18-24
4,5	40	Tidak ada	3-12/0.030	15-21	21-24
	80	Tidak ada	3-6/0.0153	6-12	15-24
	120	Tidak ada	3-9/0.0115	Tidak ada	12-24
	160	Tidak ada	3-15/0.015	Tidak ada	18-24
	200	Tidak ada	3-15/0.017	18-21	21-24
5,0	40	Tidak ada	3-15/0.0479	Tidak ada	18-24
	80	3-6	9-12/0.0191	15-18	21-24
	120	Tidak ada	3-6/0.00767	6-9	12-24
	160	3-6	6-12/0.0076	12-15	18-24
	200	3-6	6-9/0.00767	Tidak ada	12-24

Gambar 1(a-e) menunjukkan bahwa kinetika pertumbuhan sel sebagian besar tidak melalui fase lag. Hanya pada kondisi pH 5 pada volume media (80, 120 dan 200) ml melalui fase lag. Kinetika pertumbuhan sel pada semua kondisi melalui fase eksponensial dan fase kematian pada selang waktu inkubasi (3-24) jam. Fase kematian paling awal terjadi pada waktu inkubasi 12 jam yaitu pada pH 5 dan volume media (120 dan 200 ml). Volume media terbaik adalah 160 ml dan pH terbaik adalah pada pH=5. Pada kondisi ini menghasilkan jumlah sel terbanyak yaitu $10^{6,07}$. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa penambahan volume media di atas 160 ml hanya sedikit berpengaruh terhadap jumlah sel *Sacharomyces cerevisiae* yang dihasilkan. Tabel 1 menunjukkan konstante pertumbuhan spesifik berdasarkan persamaan (1- 3). Konstante kecepatan pertumbuhan spesifik (u) paling tinggi dicapai pada volume media 40 ml dan pH = 5 yaitu $u = 0.047971/\text{jam}$. Sesuai dengan (Stewart and Russell, 1985) bahwa pH terbaik pertumbuhan *S. cerevisiae* adalah antara (4,5-5).

Fase kematian disebabkan oleh inhibisi produk metabolit yang semakin lama semakin banyak sehingga pada waktu tertentu pertumbuhan berhenti dan menyebabkan sebagian sel tidak tahan terhadap daya racun produk metabolit dan berlaku fase kematian. Kecepatan kematian sel yang disebabkan oleh inhibisi produk dijelaskan oleh persamaan (7-8).

4. Kesimpulan

Dari data yang diperoleh dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Sel *S. Cerevisiae* dapat tumbuh dengan baik di dalam media kulit pisang ambon dengan konstante kecepatan pertumbuhan spesifik paling tinggi $u = 0.047971/\text{jam}$ dicapai pada pH = 5 dan volume media inokubasi = 400 ml.
2. Jumlah sel terbanyak didapatkan pada kondisi pH = 5 dan volume media inokulasi 160 ml.
3. Pola pertumbuhan sel sebagian besar tidak melalui fase lag dan fase-fase yang dilalui tergantung pada pH dan volume media.

Ucapan terimakasih

Kami mengucapkan terimakasih kepada Ika Ferlani dan Fitri Agustina yang telah membantu mengambil data selama penelitian ini.

Daftar Pustaka.

- James M, Lee., (1992), "Biochemical Engineering" , Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, hal. 42-48.
- Stewart, G.G. and Russell., (1985). "*Biology of Saccharomyces*". *Dalam Biology of Industrial Microorganism*, Cummings Publ. Inc. London.
- Vrsalovic' Presec'ki A., Vasic'-Rac'ki, Đ., (2005)., "Modelling of the alcohol dehydrogenase production in baker's yeast". *Journal of Process Biochemistry*, 40: 2781–2791.
- Woro, Y. dan Basuki., (1996), "*Mikrobiologi: Landasan Teori Untuk Praktikum*", Lab. Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta.